Aus dem Hygienischen Institut
der Westfälischen-Wilhelms-Universität zu Münster/Westf.
Direktor: Professor Dr. K. W. Jötten.

Gram-positive Gonokokken auf Göhringschem Lithiumchlorid-Ascites-Agar.

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der ärztlichen Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät der
Westfälischen Wilhelms-Universität zu Münster i. Westf.

Vorgelegt von
Hanns Freibüter
Münster i./W.
Brüderstraße 23

Buch- und Kunstdruckerei Wilh. Postberg, Bottrop i. W.
1938

Tag der mündlichen Prüfung: 4. April 1938.

Dekan: Herr Prof. Dr. Heiderich.

Berichterstatter: Herr Prof. Dr. Sartorius und Herr Prof. Dr. K. W. Jötten.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität zu Münster i. W.

Meinen lieben Eltern!

Es ist verständlich, daß im Zuge der bakteriellen Forschung durch mannigfaltige Beobachtungen unsere Anschauungen über Formen und Eigenschaften der einzelnen Erregerarten eine gewisse Umbildung erfahren mußten. Erschienen zunächst Form, Färbbarkeit und sonstige Eigenschaften als Kennzeichen, welche die Arten sicher voneinander abschieden, so zeigte sich durch die weitere Forschung, daß die Konstanz der Arteigenschaften nur als eine mehr oder minder sichere Tatsache betrachtet werden kann. Es erwies sich nicht nur, daß bestimmte Eigenschaften degenerativ verlustig gehen können, sondern daß auch phasenartig Veränderungen im Gefüge der Art möglich sind, oder daß Mutationen in gewissem Umfang aus den Arten entspringen können. Dies führte wissenschaftlich nicht nur zu Theorien und Forschungen über einen Entwicklungskreislauf im Leben einer Art, sondern auch hinsichtlich des Ineinanderübergehens von einer Art zur anderen ursprünglich davon getrennten Arten.

So folgerichtig die Forschung ihren Weg nun in Hinsicht auf die Auswertung der Erkenntnisse auch weiterhin verfolgen mag, so liegt doch für die klinische Praxis in der Fülle der Tatsachen und der oft mißverstandenen Auflockerung des Artbegriffs eine schwere Gefahr, die nur dadurch eingedämmt werden kann, daß jeder Teil der Arteigenschaften, soweit er für die Diagnostik oder Therapie Bedeutung besitzt, der Unsicherheit entzogen werden muß; es geht nicht an, daß gerade in dieser Hinsicht Beobachtungen in der Literatur zunächst unbeachtet bleiben, um späterhin das Fundament für Zweifel und Umwandlungshypothesen abzugeben.

Aus diesem Grunde beschäftigt sich auch die folgende Untersuchung mit einer Arbeit, in der eine Änderungsmöglichkeit in der Gram-Färbbarkeit bei Gonokokken behauptet ist. In dieser Arbeit, „Zur Biologie des Gonokokkus" betitelt, schreibt der Verfasser, B. Volk, Wien, daß er auf Grund der vielfach aufgeworfe-

nen Frage, ob der Neißersche Gonokokkus sich nicht auch grampositiv verhalten könne, die Möglichkeit einmal näher nachgeprüft habe. Besonders anregend für ihn war der Umstand, daß man gelegentlich von mikroskopischen Untersuchungen von Urethralabstrichen bei klinisch einwandfreien Fällen von Urethritis gonorrhoica neben typischen gramnegativen Gonokokken auch morphologisch vollkommen gleiche grampositive Diplokokken gesehen hat.

Bei 23 von 203 Patienten fand Volk nun neben gramnegativen Kokken, die nach allem als Gonokokken anzusprechen waren, auch grampositive, die gleichfalls intrazellulär gelagert sich morphologisch in keiner Weise von den typischen Neißerschen Gonokokken unterscheiden ließen.

Volk schreibt selbst: „Wir müssen uns also auf Grund dieser Feststellung der Meinung jener Autoren anschließen, die darauf hingewiesen haben, daß in Fällen von Urethritis gonorrhoica auch grampositive Gonokokken vorkommen, die morphologisch und im Hinblick auf ihre Lagerung nicht von den typischen Neißerschen Gonokokken zu trennen sind."

Dann weist er darauf hin, daß bei Benutzung der gewöhnlichen Ascites-Agarplatten zur Kultur auch in den Fällen, wo er im Nativausstrich von Urethralsekret entsprechende Keime gesehen hatte, sich jetzt in der Kultur nur gramnegative Kokken feststellen ließen. Nun versuchte Volk es auch auf anderen im allgemeinen üblichen Nährböden, wie Serumagar und Blutagar. Da auch auf diesen Nährböden keine Kultur wuchs, die grampositive Kokken enthielt, ging er daran, neue Nährböden zu versuchen, und zwar nahm er jetzt den Göhringschen Lithiumchlorid-Ascites-Agar. Dieser setzt sich wie folgt zusammen: „Zu 100 ccm Agar von einer $P_H = 7{,}8$, dem Lithiumchlorid in 1%iger Lösung zugefügt wurde, wurden 30 ccm Ascites gegeben." Der Verfasser behauptet nun, es sei ihm gelungen, auf diesen Nährböden grampositive Gonokokken zu züchten.

Bevor auf eine Nachprüfung dieser Behauptung eingegangen wird, soll kurz ein Überblick auf das in Hinsicht auf Veränderungen bei Gonokokken gesammelte Material gegeben werden.

So lesen wir über die Degenerationsformen von Asch und Adler, daß sie nach Einspritzung von Gonokokkenvaccine in großen Gaben unter die Haut im Ausfluß wieder Gonokokken auftreten sahen, und zwar in degenerierter Form, nämlich groß, gequollen, oder auch kugelförmig oder geschrumpft. Dieselben Autoren behaupten, bei ällteren Harnröhrenentzündungen nach voraufgegangenem Tripper doppelkokkenartige Gebilde gefunden zu haben, die sich grampositiv verhielten und innerhalb von Leukozyten, häufiger auf Epithelzellen, meistens jedoch frei lagen. Bender sagt dagegen, daß diese beschriebenen Degenerationsformen der Gonokokken Einlagerungen im gonorrhoischen Eiter seien, die sich als aus den Leukozyten ausgeschiedenes Glykogen und dessen Vorstufen oder als Amyloid und dessen Vorstufen erwiesen.

Herzog fand, daß die Gonokokken bei chronischem Tripper eine Abschwächung erfahren und sich in kleine Involutionsformen umwandeln. Bei günstigen Bedingung entwickeln sie sich wieder zu vollvirulenten Keimen zurück. I. Silvasi beschreibt verschiedene Gonokokkenformen, wie Mikro-, Giganto-, Mosaik- und Vakuolengonokokken. Diese verschiedenen Typen sollen zeitlich verschieden in gewisser Reihenfolge auftreten. Silvasi nennt sie nicht Degenerationsformen, sondern neue Lebensformen des Gonokokkus.

Somit sehen wir, daß außer Degenerationsformen auch andere Abarten beschrieben sind. Des öfteren treten Besonderheiten in der Kultur auf, die die Sicherheit der Diagnose sehr in Frage stellen. Zur Frage der Nährböden gibt Urban an, daß die Gonokokken auch auf gewöhnlichen Nährböden wachsen und nicht nur Glycerin-Agar für die Diagnose maßgebend ist. Zur Unterscheidung von Gonokokken und anderen Kokken, speziell Meningokokken sei erstarrtes Pferdeblut mit Glycerin-Agar geeignet.

Außer auf die Abarten und das Wachsen auf verschiedenen Nährböden ist auch auf die Färbbarkeit der Gonokokken zu achten, besonders auf ihr Verhalten gegenüber der Gramfärbung. Neben Volk haben auch andere Autoren grampositive Gonokokken gefunden. So fand E. M. Lewin bei auf Hibler-

schem Hirnbrei gezüchteten Gonokokken, daß sie, nachdem sie mit Lipoiden durchtränkt waren, grampositiv wurden. Bei anärober Züchtung traten, wie A. Buschke und E. Langer berichten, auch grampositive Kokken auf. Diese Forscher sprechen aber von verunreinigten Kulturen, weil sie neben den gramnegativen Gonokokken auch grampositive Kokken fanden. Ebenfalls wollen E. Delbanco und Fr. H. Lorentz grampositive Bakterien gefunden haben, die den Gonokokken biologisch außerordentlich nahe verwandt waren. Sie züchteten diese aus alten gonorrhoischen Prozessen. Die grampositiven Gonokokken führt Friedrich Wolf auf eine Nährbodenverschlechterung sowohl im Körper als auch in der Kultur zurück. Er sieht sie aber als weniger pathogen und als verhältnismäßig harmlose Schmarotzer an. S. Miloschewitsch, der auch Versuche mit grampositiven Diplokokken ausführte, behauptet, daß diese eine Umformung der Gonokokken seien.

Gegen alle diese Behauptungen sagt A. Cohn, daß er, trotzdem er versuchte, die Gonokokkenkulturen durch Zusätze von festen und flüssigen Nährböden oder auch durch Einwirkung verschiedener Temperaturen zu beeinflussen, in keinem Fall eine Abweichung ihrer normalen biologischen Eigenschaften feststellen konnte. Besonders betont er, daß es ihm nicht gelungen sei, die Gramnegativität der Gonokokken zu erschüttern.

Auch in der oben angegebenen Arbeit von Volk wird von grampositiven Gonokokken gesprochen. Diese Behauptung wurde nun einer genauen Prüfung unterzogen. Wie in der von Volk angegebenen Art wurden 6 verschiedene Kulturen auf Lithiumchlorid-Ascites-Agar verimpft und gezüchtet.

Zur Herstellung einer Reinkultur aus dem gonorrhoischen Eiter wurden einfache Ascites-Agar-Platten benutzt, auf die zuerst ein Ausstrich von einer frischen, nicht vorbehandelten Gonorrhoe gemacht wurde. Aus diesem wurde nach und nach eine Reinkultur gewonnen, und zwar so, daß die gewachsenen Kulturen jedesmal mit einer Lupe untersucht und so nur ganz einwandfreie Keime auf die neue Platte übertragen wurden. Während der Reinzüchtung wurden schon die Lithiumchlorid-Ascites-

Agar-Nährböden in der von Volk angegebenen Zusammensetzung hergestellt, und zwar um neue Verunreinigungen möglichst zu vermeiden, nicht in Schalen, sondern in Röhrchen. Von der gewonnenen Reinkultur wurde dann in jedesmal zwei Röhrchen überimpft, und diese standen darauf bei den ersten drei Kulturen 24, bei den anderen drei Kulturen 48 Stunden im Brutschrank. Dann wurde eine Probe gemacht. Um Irrtümer auszuschließen und um eine sichere Kontrolle zu haben, wurden auf dem gleichen Objektträger Ausstriche gemacht von der auf dem vorgeschriebenen Nährboden gewachsenen Kultur und von der auf gewöhnlichem Ascites gezüchteten Reinkultur. Wären nun die auf Lithiumchlorid-Ascites-Agar gewachsenen Kulturen grampositiv geworden, so hätten fiie sich von den anderen deutlich abheben müssen.

Zum Färben wurden die Farben in gleicher Zusammensetzung benutzt, wie Volk sie angegeben hat, und zwar: „1. Gram-Farbstoff, der wie folgt hergestellt wurde: 30 ccm helles Anilinöl wurden mit 70 ccm 95%igem Alklohol gemischt, auf 1000 ccm Aqua dest. aufgefüllt. Dieses Gemisch wurde dann in einen Kolben durch ein angefeuchtetes Filter auf 20 g Gentianaviolett filtriert und nach kräftigem Schütteln 24 Stunden in den Brutschrank gestellt bei 37°. 2. Verdünntes Karbolfuchsin, das in der Weise hergestellt wurde, daß 10 g Fuchsin in 100 ccm absolutem Alkohol gelöst wurden und dieser Farblösung 10 000 ccm eines 5%igen Karbolwassers zugefügt wurden. 3. Die benutzte Lugol'sche Lösung war die gewöhnlich verwendete.“ Diese Farblösungen wurden immer wieder frisch bereitet, und zwar in kleineren Mengen. So wurden statt 30 ccm helles Anilinöl nur 3 ccm und so von allem nur ein Zehntel der angegebenen Menge benutzt.

Trotz größter Genauigkeit konnten keine Erfolge im Sinne Volks erzielt werden.

Sechs Gonokokkenstämme standen der Reihe nach zur Verfügung. Sie wurden als Stamm A, B, C, D, E und F bezeichnet. Der Stamm A wurde achtmal überimpft, der Stamm B fünfmal, der Stamm C sechsmal, der Stamm D achtmal, der Stamm E

siebenmal und der Stamm F endlich sechzehnmal. Nach jeder Passage wurde in der oben angegebenen Art ausgestrichen und gefärbt. Doch ließen sich niemals grampositive Gonokokken finden.

Der Umfang der Prüfungen mag nicht groß erscheinen, doch bei dem absolut negativen Ergebnis dürfte er wohl genügen und das Resultat rechtfertigen.

Nun ist vom Lithiumchlorid bekannt, daß es degenerierend auf Bakterien wirkt. Daher wurde in einer 1%igen Lithiumchlorid-Lösung eine Aufschwemmung von Gonokokken gemacht. Aber auch hier ließen sich keine grampositiven Keime finden. So wurden von der Aufschwemmung nach Gram gefärbte Ausstriche nach ¼ Stunde, nach 6 Stunden und nach 24 Stunden untersucht. Die Gonokokken waren und blieben gramnegativ.

Somit können wir die Behauptung einer Änderung der Gonokokken durch Lithiumchlorid nicht anerkennen. Ob unter anderen Bedingungen eine Änderung in der Färbbarkeit möglich ist, mag dahingestellt sein. Sehr wahrscheinlich ist sie aber nicht.

Da also das Ergebnis der Nachprüfungen der Behauptung Volks ganz negativ ausfiel, d. h. da in den Kulturen, die untersucht wurden, keine grampositiven Keime zu finden waren, mußten Anhaltspunkte für diese Behauptungen gesucht werden. Sie fanden sich in einem Aufsatz L. O. Koblmüllers: „Zur Formveränderung von Keimen unter dem Einfluß von Lithiumchlorid." Der Verfasser zieht hier aus seinen Versuchen die Schlußfolgerung, daß unter dem Einfluß von Lithiumchlorid auftretende Gestaltsveränderungen von Bakterien Ausdruck einer durch dieses Salz verursachten Krankheit sind. Diese Krankheit kann nach seiner Meinung entweder ausheilen oder zum Tode des betreffenden Kleinwesens führen. Die Erkrankung dauert länger als das Leben eines solchen Kleinwesens. Daher geht sie entweder mit ihm zu Grunde oder geht auf das Teilungswesen über. Der Verfasser behauptet weiter, daß die Erkrankung auch ausheilen kann. Dies beweist sich dadurch, daß aus den krankhaften Keimen bei Weiterzüchtung wieder gesunde Keime entstehen können. Zusammenfassend sagt Koblmüller: „Es wird an Hand von über 1600 in neuartiger Weise durchgeführten Ein-

keimversuchen gezeigt, daß die Gestaltsumwandlung mancher Keime unter dem Einfluß von Lithiumchlorid Ausdruck einer durch dieses Salz hervorgerufenen Krankheit ist. Die seit Anbeginn der Bakteriologie umstrittene Frage nach der biologischen Bedeutung der Involutionsformen oder Degenerationsformen ist damit für einen Sonderfall gelöst: Es sind krankhafte Wuchsformen."

Auf derartige Siechformen sind wahrscheinlich auch die Befunde Volks zurückzuführen.

Zusammenfassung.

Es wurde die Literatur über Veränderungen bei Gonokokken zusammengefaßt und dann an Hand von 6 Versuchen die Behauptung Volks, auf Lithiumchlorid-Ascites-Agar wüchsen die Gonokokken grampositiv, geprüft. In allen 6 Versuchen, die bis ins kleinste durchgeführt wurden, blieben die Gonokokken gramnegativ. Somit läßt sich die Behauptung Volks nicht aufrecht erhalten und muß abgelehnt werden.

Literaturverzeichnis.

Asch und Adler: Münchener med. Wochenschrift 1915, S. 1305.
— Münchener med. Wochenschrift 1916, S. 73.

Bender: Dermatologische Zeitschrift 1916, S. 11.

Buschke: Deutsche med. Wochenschrift 1921, S. 64.

Cohn, Alfred: Archiv für Dermatologie 165, 790—796, 1932.

Delbanco, E., und Lorenz: Dermatologische Wochenschrift 1923, 77, S. 1137.

Herzog: Virchows Archiv, Bd. 212, 1913, S. 243, 321.

Koblmüller: Zeitschrift für Hygiene u. Infektionskrankheiten 118 Bd., 1. Heft, S. 17, 1936,

Lewin, E. M.: Arch. f. Dermatologie 167, 222, 224, 1933.

Miloschevitsch: Glasnik Centr. Hig. Zavoda 1928, 6, 7—9.

Szilvasi, J.: Dermatologische Wochenschrift 96, 296—305, 1932.

Urbahn, H.: Arch. f. Augenheilkunde Bd. 44, 1901.

Volk: Dermatologische Zeitschrift Bd. 71, S. 181.

Wolff: M. Kl. 1926 S. 1610.

Lebenslauf.

Am 19. Mai 1911 wurde ich zu Münster (Westf.) als Sohn des Oberstudienrats Ludwig Freibüter und seiner Ehefrau Maria geb. Kohlschein geboren. Nach 4 Jahren Volksschule besuchte ich das Staatliche Gymnasium Paulinum zu Münster und machte dort im Herbst 1931 mein Abitur. Dann studierte ich in Innsbruck und Münster Medizin. Am Ende des W.-S. 33/34 legte ich in Münster meine medizinische Vorprüfung ab und im W.-S. 37/38 daselbst mein medizinisches Staatsexamen. Am 4. April fand die mündliche Doktorprüfung statt. Jetzt bin ich als Medizinalpraktikant im Marienhospital in Bottrop.